

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание учёной степени кандидата биологических наук Боровковой Алены Николаевны на тему:  
«Молекулярно-генетическое разнообразие культурных и природных дрожжей рода *Saccharomyces*»  
по специальностям 1.5.18. Микология и 1.5.7. Генетика

Дрожжи являются, одной из первых одомашненных человеком групп организмов и сопровождают человечество на протяжении многих веков. Первые упоминания о дрожжах, а точнее о продукте дрожжевой ферментации – «бузе» относятся к 60 веку до н.э. Чуть позже человек научился готовить вино, пиво и выпекать хлеб, и что характерно, практически все эти продукты являются результатом деятельности одного вида дрожжей – *Saccharomyces cerevisiae*. Однако другие представители этого рода также уже нашли или могут найти применение в биотехнологии.

Целью данной работы являлось изучение природного разнообразия и эволюции дрожжей рода *Saccharomyces* на основе штаммов различного географического и экологического происхождения. В связи с этим в задачи исследования входило сравнение геномов восьми видов сахаромицетов с помощью молекулярного кариотипирования и мультигенного филогенетического анализа, изучение дивергентных популяций дрожжей комплексного вида *S. bayanus* с помощью гибридологического анализа и молекулярных маркеров с целью установления их таксономического статуса, выяснение филогенетического происхождения  $\alpha$ -глюкозидаз IMA и MAL дрожжей рода *Saccharomyces*, скрининг штаммов *Saccharomyces* различного происхождения, способных секретировать активную эндо-полигалактуроназу, и отбор штаммов с высокой пектинолитической активностью, идентификация субтеломерных генов *PGU*, контролирующих расщепление пектина у дрожжей *Saccharomyces*, и выяснение их хромосомной локализации, а также определение нуклеотидной последовательности генов *PGU* сахаромицетовых дрожжей и филогенетический анализ их пектиназ.

Первая глава диссертации посвящена истории изучения дрожжей *Saccharomyces*. В ней большое внимание уделено систематике *S. cerevisiae*, его культиваров и ближайших родственников. Однако и другие представители данного рода могут представлять большой интерес для биотехнологов: например, недавно описанный *S. jurei* способен сбраживать мальтозу и мальтотриозу, придавая более интересный вкус пиву, *S. paradoxus* – ближайший родственник *S. cerevisiae* обладает высоким пектинолитическим потенциалом, *S. bayanus* интересен тем, что способен сбраживать сахара при пониженных температурах, данное свойство используется при производстве сидра, некоторых сортов пива и игристых вин, гибриды *S. cerevisiae* с *S. kudriavzevii*, *S. bayanus* с *S. paradoxus* обладают рядом ценных технологических качеств и преимуществ в сравнении с исходными родительскими видами, например, придавая сложный вкусовой и ароматический профиль напиткам. Две другие главы литературного обзора посвящены субтеломерным генам ферментации сахаров и генам, контролирующим расщепление пектина.

В главе «Материалы и методы» приведен подробный обзор классических микробиологических и современных молекулярных и генетических методов.

В главе «Результаты и обсуждение» приведены результаты ревизии 13 коллекционных штаммов, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов и американской коллекции дрожжей Германа Фаффа, в результате которой было уточнено таксономическое положение изученных дрожжей. Кроме того, благодаря основательной ревизии, проведенной с помощью методов классической и молекулярной генетики, было установлено, что вид, *S. jurei*, который ранее был обнаружен только в Европе, встречается и на территории России (Дагестан). Также было показано, что филогенетически этот вид наиболее близок к *S. mikatae*. Использование различных молекулярных методов и гибридологического анализа позволило автору показать, что комплексный вид *S. bayanus* включает пять генетических

популяций: европейскую *S. bayanus* var. *bayanus*, космополитные *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus*, а также новозеландскую и западнокитайскую.

Благодаря изучению генов изомальтаз IMA и мальтаз MAL показано, что роды *Saccharomyces*, *Lachancea* и *Kluveromyces* произошли от общего протоплоидного предка.

Пектинолитические ферменты находят широкое применение в биотехнологии и используются для осветления фруктовых соков и вина, ферментации чая и кофе, очистки растительных волокон и сточных вод, отбеливания бумаги и других биотехнологических производств. На долю пектиназ приходится около четверти мировых продаж пищевых ферментов, и их производство постоянно увеличивается. Наибольшее применение пектинолитические ферменты находят в виноделии и при производстве плодовых соков. Практически все ферментные препараты пектиназ получают с помощью мицелиальных грибов *Aspergillus* и *Trichoderma*. Однако коммерческие препараты микромицетного происхождения, помимо эндо-полигалактуроназы, содержат примеси с нежелательной активностью, например, пектинэстеразой, которая приводит к повышенному содержанию в напитках токсичного метанола. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* обычно не секретируют пектинэстеразу, поэтому их пектиназы безопасны для осветления фруктовых соков и вина, к тому же ранее было показано, что их использование в виноделии приводит к эффективному осветлению вина и сокращению времени его фильтрации вдвое.

Помимо *S. cerevisiae* наличие активных пектиназ известно и у дрожжей *S. bayanus*. Автором диссертации было показано, что способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является также видовой особенностью *S. paradoxus* – вида, являющегося двойником *S. cerevisiae*, но не используемого в биотехнологической промышленности. А между тем, данный вид широко распространён в природе, неплохо известно о его географии и субстратной приуроченности, благодаря чему есть возможность

вести направленный поиск штаммов, представляющих практическую ценность.

Глава «Результаты и обсуждение» написана очень подробно и тщательно. На мой взгляд, прекрасно, что в конце каждого раздела этой главы есть подраздел «Обсуждение», который по сути является обобщением, содержащейся в главе информации, и очень помогает лучшему восприятию результатов работы.

Принципиальных замечаний к диссертации нет, однако необходимо отметить ряд вопросов, возникших по ходу прочтения текста диссертации:

1. в главе «Материалы и методы» указано, что для определения способности дрожжей сбраживать мелибиозу использовалась среда следующего состава: мелибиоза – 20 г/л, дрожжевой экстракт – 10 г/л, пептон – 20 г/л. Однако, например, в определителе дрожжей (Kurtzman et al., 2011) приводится такой состав среды для определения ферментативной активности – 4.5 г/л дрожжевого экстракта, 7.5 г/л пептона, 20 г/л сахара. А в книге И.П. Бабьевой и В.И. Голубева «Методы выделения и идентификации дрожжей» (1979) для этой цели предлагается среда, содержащая 5 г/л дрожжевого экстракта и 20 г/л сахара. С какой целью Вами была выбрана среда с таким высоким содержанием пептона?
2. в приложении П4 у некоторых штаммов *S. paradoxus* указан индекс «М», далее на странице 214 в списке сокращений указано, что данный индекс относится к штаммам, полученным из коллекции микроорганизмов Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия «Магарач» РАН. Действительно ли штаммы упомянутые на страницах 205-206 получены из данной коллекции?

В литературном обзоре и библиографическом списке встречается ряд погрешностей:

1. во внутритекстовых ссылках после фамилий авторов, «и др.» или «et al.» и перед годом следует ставить запятую, в большинстве случаев в работе это правило соблюдается, однако в некоторых местах, например, на страницах 35 и 56 запятые пропущены;
2. в тексте неоднократно встречается ссылка Naumov et al., 2000a, но ни в работе, ни в библиографическом списке нет ссылки Naumov et al., 2000b;
3. в библиографическом списке под номером 201 есть источник Naumova et al., 2011a, при этом в тексте работы такая ссылка отсутствует, и ссылка Naumova et al., 2011b отсутствует тоже;
4. ссылки (Gonzales et al., 2006; Gonzales et al., 2008) на странице 48 или (Naumov et al., 1990; Naumov et al., 1996b) на странице 55 можно было бы объединить и оформить следующим образом – (Gonzales et al., 2006, 2008), (Naumov et al., 1990, 1996b);
5. неправильно в библиографическом списке расположены ссылки 32 и 33, 83 и 84, 93 и 94, нарушен порядок ссылок 39-46;
6. ссылки на интернет-ресурсы обычно приводят не в библиографическом списке, а выносят отдельно;
7. слово «complex» в словосочетании «*Saccharomyces complex*» в ссылке 141 ошибочно закурсивлено;
8. на страницах 118 и 123 в подписях к рисункам даны полные названия дрожжей, хотя в научных работах принято при первом упоминании давать полное название вида, а далее приводить сокращённый вариант родового эпитета;
9. если в тексте, не в библиографическом списке, встречаются фамилия с инициалами, то принято сначала указывать инициалы, а потом фамилию;
10. на странице 205 в латинском названии брусники допущена ошибка – видовой эпитет «*vitis-idaea*» написан с опечатками «*vitis -doea*».

На страницах диссертации встречаются и другие немногочисленные опечатки, пунктуационные и орфографические ошибки. Вместе с тем,

указанные замечания ничуть не умаляют значимости диссертационного исследования.

Диссертация отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.18. Микология и 1.5.7. Генетика (по биологическим наукам), а также критериям, определённым пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Боровкова Алена Николаевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.18. Микология и 1.5.7. Генетика.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Максимова Ирина Аркадьевна

06 мая 2024 года

Контактные данные: тел.: \_\_\_\_\_, e-mail: \_\_\_\_\_

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.07 – Микробиология

Адрес места работы: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», факультет почвоведения

Подпись сотрудника факультета почвоведения  
И.А. Максимовой удостоверяю:

Учёный секретарь факультета  
06.05.2024 г.

Ю.А. Микулина